

PRODUCTION OF BIOFILAMENTS IN TRANSGENIC ANIMALS

Publication number: JP2002506642T

Publication date: 2002-03-05

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: C07K14/435; C12N15/85; C07K14/435; C12N15/85; (IPC1-7):
C12N15/09; A01K67/027; C12N5/10; C12P21/02

- european: C07K14/435A2A; C12N15/85A1

Application number: JP20000536844T 19990312

Priority number(s): WO1999IB00763 19990312; US19980040518 19980317

Also published as:



WO9947661 (A3)

WO9947661 (A2)

EP1064367 (A3)

EP1064367 (A2)

US2001042255 (A1)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2002506642T

Abstract of corresponding document: US2001042255

Disclosed is a method for the recombinant production of biofilaments, such as spider silk or insect fibroins, using transgenic animals which secrete the biofilaments in their milk and/or urine, and transgenic cells which secrete the biofilaments into culture media. Such a method is useful for producing large quantities of biofilament material. Also disclosed is a nucleic acid molecule for generating such transgenic animals.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Inventors/~~Applicants (for US only)~~: KARATZAS, Costas, N.
[CA/CA]; 251 Sherwood, Beaconsfield, Quebec H9W 2H4
(CA). TURNER, Jeffrey, D. [CA/CA]; 1 Riley Road, Hud-
son, Quebec J0P 1H0 (CA). KARATZAS, Anthoula-Lazaris
[CA/CA]; 251 Sherwood, Beaconsfield, Quebec H9W 2H4
(CA).

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-506642

(P2002-506642A)

(43)公表日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-コード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02		5/00	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21)出願番号 特願2000-536844(P2000-536844)
(86)(22)出願日 平成11年3月12日(1999.3.12)
(85)翻訳文提出日 平成12年9月14日(2000.9.14)
(86)国際出願番号 P C T / I B 9 9 / 0 0 7 6 3
(87)国際公開番号 W O 9 9 / 4 7 6 6 1
(87)国際公開日 平成11年9月23日(1999.9.23)
(31)優先権主張番号 0 9 / 0 4 0 , 5 1 8
(32)優先日 平成10年3月17日(1998.3.17)
(33)優先権主張国 米国 (US)
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
T , L U , M C , N L , P T , S E) , E A (A M , A Z
, B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A U
, B R , C A , C N , J P , N Z , S G , U S

(71)出願人 ネクシア バイオテクノロジーズ, イン
コーポレイテッド
カナダ国 エイチ9エックス 3アール2
ケベック, セント アン デ ベルビ
ュ, トランス-カナダ ハイウェイ
21, 025
(72)発明者 カラザス, コスタス エヌ.
カナダ国 エイチ9ダブリュー 2エイチ
4 ケベック, ペーコンズフィールド,
シャーウッド 251
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスジェニック動物における生体フィラメントの産生

(57)【要約】

生体フィラメントをその乳汁および/または尿中に分泌
するトランスジェニック動物、ならびに培養培地中に生
体フィラメントを分泌するトランスジェニック細胞を使
用する、生体フィラメント（例えば、クモの糸または昆
虫のフィブロイン）の組換え産生のための方法が開示さ
れる。このような方法は、大量の生体フィラメント物質
を産生するために有用である。このようなトランスジェ
ニック動物を作製するための核酸分子もまた開示され
る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸分子であって、(i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 乳汁産生細胞または尿産生細胞において、ポリペプチドの発現を指向するプロモーターであって、該プロモーターが該配列に作動可能に連結されている、プロモーター、ならびに(iii) 該乳汁産生細胞または該尿産生細胞による、それぞれ、哺乳動物の乳汁または尿中への、該生体フィラメントの分泌を可能にするリーダー配列、を含む、核酸分子。

【請求項 2】 核が請求項 1 に記載の核酸分子を含む、哺乳動物の胚。

【請求項 3】 雌性哺乳動物であって、該雌性哺乳動物の乳房組織のゲノムが、請求項 1 に記載の核酸分子を含み、ここで前記プロモーターが乳汁産生細胞特異的である、雌性哺乳動物。

【請求項 4】 前記哺乳動物がげっ歯類、反すう動物、およびヤギからなる群から選択される、請求項 3 に記載の哺乳動物。

【請求項 5】 動物であって、該動物における尿の産生に寄与する細胞のゲノムが、請求項 1 に記載の核酸分子を含み、ここで前記プロモーターが尿産生細胞特異的である、動物。

【請求項 6】 前記動物が哺乳動物である、請求項 5 に記載の動物。

【請求項 7】 前記生体フィラメントがクモの糸である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】 前記クモの糸がドラグライン糸である、請求項 7 に記載の核酸分子。

【請求項 9】 前記生体フィラメントが、分泌物が剪断力および機械的伸長に供されるように分泌される場合にヘリックスから β シートへの遷移を受けるポリアラニンセグメントを有し、該遷移が該生体フィラメントの構造を安定化する β 結晶を形成する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】 前記生体フィラメントが β シート間の間隔が3オングストロームと8オングストロームとの間の大きさであるような、 β ブリーツシートを形成する非晶質ドメインを有する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 11】 前記生体フィラメントが非晶質ドメインおよび結晶形成ド

メインを含むC末端アミノ酸モチーフを有し、該モチーフが配列番号2に少なくとも50%同一である配列を有する、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項12】 前記生体フィラメントが、配列番号3に少なくとも50%同一であるコンセンサス配列を有する、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項13】 生体フィラメントを産生するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) トランスフェクトされた胚細胞に由来する細胞から該生体フィラメントを発現し、そしてその分泌を生じる、生体フィラメントコード核酸分子でトランスフェクトされた該胚細胞を提供する工程；

(b) 該胚細胞を増殖させ、生体フィラメント発現および分泌細胞を含む動物を産生する、工程；ならびに

(c) 該動物由来の該生体フィラメント発現および分泌細胞から該生体フィラメントを単離する工程、
を包含する、方法。

【請求項14】 生体フィラメントを産生するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) (i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 動物細胞においてポリペプチドの発現を指向するプロモーター、および(iii) 該細胞による該生体フィラメントの分泌を生じるリーダー配列、を含む核酸分子でトランスフェクトされた動物細胞を提供する工程；

(b) 該トランスフェクトされた細胞を培養する工程；および

(c) 該培養されたトランスフェクトされた細胞の培養培地から該生体フィラメントを単離する工程、
を包含する、方法。

【請求項15】 前記生体フィラメントがクモの糸である、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】 前記クモの糸がドラグライン糸である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記生体フィラメントが、分泌物が剪断力および機械的伸

長に供されるように分泌される場合にヘリックスから β シートへの遷移を受けるポリアラニンセグメントを有し、該遷移が該生体フィラメントの構造を安定化する β 結晶を形成する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項18】 前記生体フィラメントが β シート間の間隔が3オングストロームと8オングストロームとの間の大きさであるような、 β プリーツシートを形成する非晶質ドメインを有する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項19】 前記生体フィラメントが非晶質ドメインおよび結晶形成ドメインを含むC末端アミノ酸モチーフを有し、該モチーフが配列番号2に少なくとも50%同一である配列を有する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項20】 前記生体フィラメントが、配列番号3に少なくとも50%同一であるコンセンサス配列を有する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項21】 前記動物が哺乳動物である、請求項13または14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

クモの糸のタンパク質の「超フィラメント (super filament)」として有用性は、組換えクモのドラグラインの糸を産生する試みを導いた (Princeら、Biochemistry 34:10879-10885、1995; FahnestockおよびIrwin、Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:23-32、1997; FahnestockおよびBedzyk、Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:33-39、1997)。クモの糸の首尾よい発現は、E. coliにおいて実証されているが、顕著な問題が残ったままである。このような問題としては、例えば、その遺伝子の反復性の領域における組換えおよび再配置に起因する使用した配列の不安定性、非効率的な転写、翻訳休止、および合成の未熟な終結であり、これらは、効率的に産生され得る糸の長さにおける限定 (1000アミノ酸以下)、低タンパク質収量 (4~300mg/リットル) および産生される繊維の低溶解性をもたらす。

【0002】

メチル栄養性酵母 *Pichia Pastoris* における合成クモドラグライン糸のタンパク質の産生は、少なくとも1600アミノ酸長のより長いタンパク質が、合成の未熟な終結および発現される遺伝子における反復性配列の安定性に起因して観察される大きさの不均一性を伴わずに効率よく産生され得るという点で、E. coliのそれよりも優れている。*Pichia*系におけるタンパク質の収量は、663mg/リットルであるが、この15%のみが、酵母の細胞溶解物において可溶性形態であった。

【0003】

クモは、「糸の前駆体」を、液体結晶タンパク質として産生し、この前駆体を、一連の出糸突起機構を通じてこの可溶性の糸を引っ張ることによって、クモはフィラメントへと紡ぐ。

【0004】

以下の後の実施例は、本発明者らが、真核生物細胞およびトランスジェニックマウスの乳汁中に糸の分子の可溶性サブユニットの産生および分泌を実施するためにまとめたことを例示する。これらの可溶性のサブユニットは、フィラメントを生成するための紡錘目的のために、精製され得、そして使用され得る。

【0005】

(発明の要旨)

本発明者らは、生体フィラメント（例えば、クモの糸タンパク質）をトランスジェニック動物において産生するための方法を発見した。この方法は、「超フィラメント」として有用であるこれらのタンパク質の産生を大いに容易にする。

【0006】

第1の局面において、本発明は、以下を含む核酸分子を特徴とする：(i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 乳汁産生細胞または尿産生細胞におけるポリペプチドの発現を指向するプロモーターであって、ここで、このプロモーターは、上記の核酸配列に作動可能に連結されている、プロモーター、および(iii) 乳汁産生細胞または尿産生細胞によって、哺乳動物のそれぞれ乳汁または尿中への生体フィラメントの分泌を可能にするリーダー配列。

【0007】

第2の局面において、本発明は、その核が以下を含む核酸分子を含む哺乳動物の胚を特徴とする：(i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 乳汁産生細胞または尿産生細胞におけるポリペプチドの発現を指向するプロモーターであって、ここで、このプロモーターは、上記の核酸配列に作動可能に連結されている、プロモーター、および(iii) 乳汁産生細胞または尿産生細胞によって、その核酸分子を含む胚から発生した哺乳動物のそれぞれ乳汁または尿中への生体フィラメントの分泌を可能にするリーダー配列。好ましくは、その核酸分子は、人工的に挿入されている。

【0008】

第3の局面において、本発明は、その乳腺組織のゲノムが以下を含む核酸分子を含む雌性哺乳動物を特徴とする：(i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 乳汁産生細胞におけるポリペプチドの発現を指向するプロモーター

であって、ここで、このプロモーターは、上記の核酸配列に作動可能に連結されている、プロモーター、および (i i i) 乳汁産生細胞によって、その雌性哺乳動物のそれぞれ乳汁への生体フィラメントの分泌を可能にするリーダー配列。好ましくは、その雌性哺乳動物は、齧歯類、反芻動物またはヤギ類である。

【 0 0 0 9 】

第 4 の局面において、本発明は、細胞のゲノムが以下を含む核酸分子を含む動物における尿産生に寄与する動物を特徴とする： (i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、 (i i) 尿産生細胞におけるポリペプチドの発現を指向するプロモーターであって、ここで、このプロモーターは、上記の核酸配列に作動可能に連結されている、プロモーター、および (i i i) 尿産生細胞によって、その雌性哺乳動物の尿中への生体フィラメントの分泌を可能にするリーダー配列。好ましくは、その動物は哺乳動物である。

【 0 0 1 0 】

本発明の上記の全ての局面の 1 つの実施態様において、その生体フィラメントは、クモの糸（すなわち、ドラグラインの糸）である。本発明の上記の全ての局面の別の実施態様において、その核酸分子は、イントロンを含む。好ましい実施態様において、その分泌が剪断力および機械的伸長に供されるように分泌される場合、その生体フィラメントは、ヘリックスから β シートへの転移を受けるポリアラニンセグメントを有する。ここで、この転移は、その生体フィラメントの構造を安定化させる β 結晶を形成する。

【 0 0 1 1 】

本発明の上記の全ての局面の別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、 β シート間の間隔が 3 Å と 8 Å との間の大きさであるように β プリーツシートを形成する非晶質ドメインを有する。さらに別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、非晶質ドメインおよび結晶形成ドメインを含む C 末端アミノ酸モチーフを有し、ここで、そのモチーフは、配列番号 2 と少なくとも 5 0 % 同一である配列を有する。さらに別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、配列番号 3 と少なくとも 5 0 % 同一であるコンセンサス配列を有する。

【0012】

第五の局面において、本発明は、以下の工程を包含する、生体フィラメントを産生するための方法の特徴とする：(a) トランスフェクトされた胚の細胞に由来する細胞からその生体フィラメントを発現し、そしてその分泌を生じさせる生体フィラメントコード核酸分子を用いてトランスフェクトされた胚の細胞を提供する工程；(b) その胚の細胞を増殖させて、生体フィラメントを発現し、そして分泌する細胞を含む動物を作製する工程；および(c) その生体フィラメントを発現し、そしてその動物の分泌している細胞からその生体フィラメントを単離する工程。

【0013】

第六の局面において、本発明は、以下の工程を含む、生体フィラメントを産生するための方法の特徴とする：(a) 以下を含む核酸分子を用いてトランスフェクトされた動物細胞を提供する工程：(i) 生体フィラメントをコードする核酸配列、(ii) 動物細胞におけるポリペプチドの発現を指向するプロモーター、および(iii) その細胞によるその生体フィラメントの分泌を生じさせるリーダー配列；(b) そのトランスフェクトされた細胞を培養する工程；ならびに(c) その培養されたトランスフェクトされた細胞の培養培地から生体フィラメントを単離する工程。他の実施態様において、その生体フィラメントは、以下の配列と50%同一である配列を有する：配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20。

【0014】

本発明の第五および第六の局面の1つの実施態様において、その生体フィラメントは、クモの糸（例えば、ドラグラインの糸）である。別の実施態様において、その核酸分子は、イントロンを含む。さらに別の実施態様において、その動物は哺乳動物である。好ましい実施態様において、その分泌が剪断力および機械的伸長に供されるように分泌される場合、その生体フィラメントは、ヘリックスから β シートへの転移を受けるポリアラニンセグメントを有する。ここで、この転移は、その生体フィラメントの構造を安定化させる β 結晶を形成する。

【0015】

本発明の第五および第六の局面の別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、 β プリーツシート間の間隔が3 Åと8 Åとの間の大きさであるように β プリーツシートを形成する非晶質ドメインを有する。別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、非晶質ドメインおよび結晶形成ドメインを含むC末端アミノ酸モチーフを有し、ここで、そのモチーフは、配列番号2と少なくとも50%の同一性である配列を有する。さらに別の好ましい実施態様において、その生体フィラメントは、配列番号3と少なくとも50%同一であるコンセンサス配列を有する。他の実施態様において、その生体フィラメントは、以下の配列と50%同一である配列を有する：配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20。

【0016】

その生体フィラメントがドラグライン系である本発明の上記の全ての局面の好ましい実施態様において、好ましくは、その細胞（または、その細胞から発生した動物（例えば、哺乳動物））は、天然供給源において（例えば、クモにおいて）産生されたこれらのポリペプチドの比率が少なくとも40%である比率でそのドラグライン系を産生するのに必要なポリペプチド（例えば、ADF-3およびADF-4）の両方を産生する。

【0017】

「生体フィラメント」とは、種々の昆虫および蛛形類のいずれか1つによって通常産生され、そして分泌される繊維性タンパク質を意味する。生体フィラメントは、変化する結晶および無定形領域から構成される。例示的な生体フィラメントは、クモの糸（種々の蛛形類（例えば、*Nephila clavipes*）に見出される外部で紡ぐ（externally spun）繊維タンパク質分泌）、およびフィブロイン（種々の昆虫（例えば、*Bombyx mori*）において見出される外部で紡ぐ繊維タンパク質分泌）を含む。好ましい生体フィラメントは、その分泌が剪断力および機械的伸長に供されるように分泌される場合、ポリアラニンセグメントを有し、結晶形成ドメインを形成し、ヘリックスから

β シートへの転移を受け、その構造を安定化させる β 結晶を形成する。好ましくは、生体フィラメントの無定形ドメインは、 β プリーツシートを形成し、その結果、 β シート間の間隔は、3 Åと8 Åとの間の大きさであり、好ましくは、3.5 Åと7.5 Åとの間の大きさである。

【0018】

好ましくは、生体フィラメントは、20～40の間のアミノ酸長、より好ましくは、34アミノ酸長であるアミノ酸反復モチーフ、および33⁰～55の間のアミノ酸長であり、より好ましくは47アミノ酸長であるコンセンサス配列を有するC末端部分を有する。好ましくは、生体フィラメントは、配列番号2の配列と少なくとも50%同一、より好ましくは、少なくとも70%同一、および最も好ましくは配列番号2と少なくとも90%同一である配列を有するアミノ酸反復モチーフ（無定形ドメインおよび結晶形成ドメインの両方を創出する）を有する。好ましくは、生体フィラメントは、配列番号3の配列と少なくとも50%同一、より好ましくは少なくとも70%同一、および最も好ましくは配列番号3と少なくとも90%同一のコンセンサス配列を有する。

【0019】

「プロモーター」とは、転写を指向するに充分である核酸配列を意味する。本発明においては、細胞型特異的、組織特異的、または外部シグナルもしくは薬剤によって誘導性であるために制御可能なプロモーター依存性遺伝子発現を付与するに充分であるプロモーターエレメントもまた包含される。そのようなエレメントは、ネイティブ遺伝子の5'領域または3'領域に配置され得る。本発明の好ましいプロモーターは、乳汁産生細胞におけるタンパク質の転写を指向する；そのようなプロモーターとしては、限定することなく、以下の遺伝子由来のプロモーターが挙げられる：乳清酸性タンパク質、 α S1-カゼイン、 α S2-カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、および α -ラクトアルブミン。本発明の他の好ましいプロモーターは、尿産生細胞（例えば、尿上皮細胞または腎臓細胞）におけるタンパク質の転写を指向する；そのようなプロモーターとしては、限定することなく、ウロプラキン遺伝子からのプロモーターが挙げられる。本発明のさらに別の好ましいプロモーターは、胚細胞におけるタン

パク質の転写を指向する。

【0020】

「リーダー配列」または「シグナル配列」とは、核酸分子に作動可能に連結される場合に、その核酸分子の産物の分泌を可能にする核酸配列を意味する。そのリーダー配列は、好ましくは、その核酸分子の5'側に配置される。好ましくは、そのリーダー配列は、その核酸分子の転写を指向するために使用されるプロモーターと同じ遺伝子から得られるか、またはその核酸分子が由来する遺伝子から得られる。

【0021】

「培養培地」とは、細胞を取り囲み、そしてその細胞がその中で生存している培地を意味する。その細胞が、タンパク質（例えば、生体フィラメント）を分泌している場合、その細胞の培養培地は、その細胞によって分泌されるタンパク質を含む。

【0022】

「トランスフェクトされた細胞」または「形質転換された細胞」とは、組換えDNA技術によって、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子が導入された細胞（または、その祖先細胞へ導入された細胞）を意味する。好ましくは、その細胞は、多細胞動物（例えば、哺乳動物）由来の真核生物細胞である。

【0023】

「胚細胞」とは、生物の全ての体細胞および生殖系列細胞にとって前駆体であり得る細胞を意味する。例示的な胚細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）および受精した卵母細胞である。好ましくは、本発明の胚細胞は、哺乳動物胚細胞である。

【0024】

「内因性」とは、本明細書において遺伝子またはポリペプチドを参照して使用される場合、動物に通常存在する遺伝子またはポリペプチドを意味する。

【0025】

「生殖系列細胞」とは、減数分裂性の細胞分裂の産物である、真核生物細胞、前駆体、その子孫を意味する。

【0026】

「作動可能に連結される」とは、適切な分子（例えば、転写アクチベータータンパク質）がその調節配列に結合される場合に、核酸分子および1以上の調節配列（例えば、プロモーター）が、その核酸分子の産物（すなわち、ポリペプチド）の発現および／または分泌を可能にする様式で接続されていることを意味する。

【0027】

導入遺伝子とは、細胞またはその祖先に人工的に挿入されており、そしてその細胞から発生した動物のゲノムの一部となっている核酸の任意の片を意味する。このような導入遺伝子は、そのトランスジェニック動物に対して部分的または全体的に異種（すなわち、外来性）である遺伝子を含み得るか、またはその動物の内因性遺伝子に対して同種の遺伝子を表し得る。

【0028】

「トランスジェニック」とは、細胞またはその祖先に人工的に挿入され、そしてその細胞から発生する動物のゲノムの一部になっている核酸配列を含む任意の細胞を意味する。好ましくは、トランスジェニック動物は、トランスジェニック哺乳動物（例えば、齧歯類または反芻動物）である。好ましくは、核酸（導入遺伝子）は、その核ゲノムに人工的に挿入されている。

【0029】

（詳細な説明）

生体フィラメント（例えば、クモの糸）は、多数の高度な性能の機械的特性を有する。この特性によって、クモの糸は、「超フィラメント」であるSpectra™（Allied Signalから市販されている）またはKevlar™（DuPontから市販されている）に匹敵する。特に重要であるのは、生体フィラメントを破壊するエネルギー（これは、伸長させる場合に、生体フィラメントがエネルギーを吸収し得、そしてそのストレスが除去される場合にそのエネルギーを熱として散逸させ得ることを意味する）である。さらに、生体フィラメントは、タンパク質分解酵素による消化に抵抗性であり、そして希酸および希塩基において不溶性である。

【0030】

生体フィラメントは、再生可能な材料の天然供給源である。生体フィラメントを発現するトランスジェニック動物（例えば、本明細書において記載される動物）は、利用可能な食餌を使用して通常の家畜として生き長らえられ得る。従って、この物資の製品は、家庭用であり、そして再生可能である。本当の天然供給源であるクモ自体は、不幸なことに、意義ある量のこの材料を産生するには小さすぎる。さらに、クモは、縄張り性の行動を提示することから、クモは大量生産のために密接した空間で飼育され得ない。

【0031】

生体フィラメントの重量は、衝撃保護の適用のために重要である。現在の衝撃保護における需要は、その独特な機械的特性を維持する可撓性でありかつ軽い材料を必要とする。生体フィラメントは、KevlarTMよりも軽く、そしてSpectraTMよりも可撓性である。

【0032】

(1. クモの糸をコードする遺伝子)

ネイティブのドラグライン糸タンパク質の大きさは、終局的には決定されていないが、274kDa~750kDaの範囲内であることが観察されている。N末端アミノ酸配列および5'末端核酸配列は、明らかにされていない。Nephilia clavipes（ブラジルおよび南フロリダにおいて見出される黄金色の丸いクモ（golden orb weaver））ならびにAraneus diadematus（Gueretteら、Science 272: 112-115、1996）からの部分的cDNAクローン（スピドロイン1およびスピドロイン2）が単離され、そしてそれらの対応する遺伝子の3'末端の部分であることが見出されている。Araneusから単離されたクローン、およびそれらが由来する腺の概要を、以下の表1に示す。

【0033】

【表1】

Araneus diadematus遺伝子(N. clavipesからのスピドロイン-1、2を用いてスクリーニングされたライブラリー)

特定の系の型の分布-発現(ノーザンブロットによって決定した)

クローニングした遺伝子	大型管足瓶腺(ドラグライン糸を産生する)	小型足瓶腺(付随性繊維を産生する)	鞭毛状腺(粘性糸を産生する)	凝集腺(粘性糸を産生する)	円柱状腺(繭糸を産生する)
ADF-1	-----	大量	-----	-----	-----
ADF-2	-----	-----	-----	-----	少量
ADF-3	大量	-----	少量	少量	-----
ADF-4	大量	-----	-----	-----	-----

ADF-1 (Araneus diadematusフィブロイン) の配列は、68%がポリ(A)₅ (すなわち、AAAAA; 配列番号9) または(GA)₂ (配列番号10) であり、そして32%がGGYGQGY (配列番号11) である; ADF-2は、19%がポリ(A)₈ (配列番号12) であり、そして81%が[GGAGQGGY (配列番号13) およびGGQGGQGGYGGLGSQGA (配列番号14)] である; ADF-3は、21%がASAAAAAA (配列番号15) であり、そして79%が[(GPGQQ)_n であり、ここでn = 1~8 (配列番号16) およびGPGGQGPGY (配列番号17)] であり; そしてADF-4は、27%がSSAAAAAAA (配列番号18) であり、そして73%が[GPGSQGPS (配列番号19) およびGPGGY (配列番号20)] である。

【0034】

当該分野で周知の種々の手順のいずれかを利用して、NephilaおよびAraneus由来の公知の核酸配列を用いてさらなる生体フィラメントコード遺伝子をクローニングし得る。そして、当業者は、慣用的に、これらの方法の一つを、所望の遺伝子を取得するために適用する。NephilaおよびAraneus遺伝子の全長クローンも、同様に単離され得る。

【0035】

生体フィラメントをコードする遺伝子配列を取得するための1つのそのような方法は、*Nephila clavipes*のスピドロイン (spidroin) 1遺伝子配列によって生成されるオリゴヌクレオチドプローブ (Arcidi aconoら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 31-38、1998) を使用して、そのプローブにハイブリダイズする配列について蛛形類または昆虫のcDNAもしくはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることである。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知であり、そして、例えば、Ausubelら、前出およびSambrookら、前出に記載される。cDNAまたはゲノムDNAのライブラリーの調製もまた、当該分野において周知である。種々の種から調製された核酸ライブラリーの大多数もまた、市販されている。このオリゴヌクレオチドプローブは、本明細書において記載される配列および標準的な技術を用いて容易に設計される。このオリゴヌクレオチドプローブは、スピドロイン1遺伝子産物をコードするDNAのいずれかの鎖の配列に基づき得る。例示的なオリゴヌクレオチドプローブは、縮重プローブである (すなわち、*N. clavipes*のスピドロイン1タンパク質についてのすべての可能なコード配列の混合物)。

【0036】

(11. クモの糸形成および紡錘)

糸またはフィブロインのモノマーは、クモの腹部における特定の腺内において産生され、そして腔において、20~30%の濃度で保持される。この材料は、乾燥の存在下で張力が適用される場合に重合化する。その糸が非常に薄い場合、その乾燥プロセスは、迅速である。糸は、変化する結晶および無定形領域から構成される。優勢な結晶は、糸の繊維の長軸方向に並行に整列された β ブリーツシートの結晶である。*Bombyx mori* (カイコ) において、結晶形成ドメインは、無定形ドメインで変化する6つのペプチド (GAGAGS (配列番号1)) ドメインである。

【0037】

アミノ酸G、A、およびSは、85%を超えるカイコの繭の糸のフィブロインを構成する。糸の交互のAla残基またはSer残基およびGly残基は、所定

の β シートの反対側に伸び、その結果、一方の β シートから伸びるAla側鎖が、隣接するシートのAla側鎖の間に効率的に添い、そしてGly側鎖についても同様である。隣接する β シートからのGly側鎖は、AlaおよびSerの側鎖と同様に、接触する。従って、シート間の間隔は、Nephilaドラグライン糸 (dragline silk) のX線回折研究から決定した場合、3.5オングストロームおよび5.7オングストロームの交互の値を有する。この間隔は、 β シートコンホメーションの合成ポリ-L-アラニンペプチドの間隔と同一である。Araneus diadematusドラグライン糸のX線回折研究は、約7.5オングストロームという、より大きなシート間間隔を示す (Goslineら, Biomimetics: Design and Processing of Materials, 237-261頁、SarikayaおよびAksay, Amer. Inst. of Physics, 1995)。

【0038】

Nephilaでは、主要な管足瓶囊腺 (MA腺) は、ドラグライン糸を生成する。これまでにクローニングされたNephila MA腺生成遺伝子のC末端部分 (スピドロイン1 (spidroin 1) およびスピドロイン2) は、以下の配列を有する：34アミノ酸長の反復モチーフ (非晶質ドメインおよび結晶形成ドメインの両方を形成する)；および47アミノ酸長のコンセンサス配列 (XuおよびLewis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:7120-7124, 1990; BeckwitttおよびArcidiacono, J. Biol. Chem. 269:6661-6663, 1994)。

【0039】

Nephilaスピドロイン1の34アミノ酸長の反復モチーフ (非晶質ドメインおよび結晶形成ドメインの両方を形成する) は、以下の配列を有する：AGQ GGY GGL GSQ GAG RGG LGG QGA GAA AA A AAG G (配列番号2)。配列番号2のC末端のポリアラニン領域 (AAAAA)、ならびに非晶質ドメインを形成する多数のグリシンブロック (3アミノ酸によって隔てられた2つのグリシン残基；例えば、GG LGG) に留

意されたい。

【0040】

Nephilaスピドロイン2の47アミノ酸長のコンセンサス配列は、以下の配列を有する：CPG GYG PGQ QCP GGY GPG QQC
PGG YGP GQQ GPS GPG SAA AAA AAA AA (配
番号3)。

【0041】

糸は、個々の腺の中に分泌される；分泌物が剪断力および機械的伸長に供された場合、ポリアラニン（結晶形成）セグメントはヘリックスから β シートに遷移し、その構造を安定化する β 結晶を形成する。グリシンブロックは、結晶領域間に置かれた非晶質ポリペプチド鎖を形成する部分と命名される。

【0042】

生体フィラメント (biofilament) は、非常に特殊化された解剖学的適応および遺伝子の進化を有する特定の昆虫および蛛形類において進化した。クモでは、糸は、一連の腹部の腺から生成される。結晶の形成およびサイズは、とりわけ、一次アミノ酸組成に依存し得る。主要な糸の生成および分泌は、大型管足囊 (MA) 腺、鞭毛状 (FL) 腺、および円柱状 (CY) 腺において生じ、これらの腺はそれぞれ、ドラグライン糸、粘性糸、および繭糸を生成する。本明細書中に記載されるトランスジェニック動物、およびこのような動物を作製するために用いられる構築物は、これらの任意の生体フィラメントまたはそれらの任意のバリエーションを生成し得、その結果、3.5～7.5オングストロームの間の β シート間間隔を有する生体フィラメントが生成されることが理解される。

【0043】

(A. ドラグライン糸)

MA腺は、2つのタンパク質を3:2の比で生成し、これらのタンパク質には、グリシン、アラニン、およびプロリンが豊富である。これらのタンパク質は、ドラグライン糸を形成し、これは命綱 (lifeline)、骨格糸、およびクモの巣の枠である。ドラグライン糸は、高弾性繊維であり、ナイロンと類似の特性を有する。ドラグライン糸は、20～30容量%の結晶を含み、そして以下の

特徴を有する：剛直性（初期ヤング率は10 GPaである）、強度（張力の強度は1.5 GPaである）、および弾力性（切断するのに必要なエネルギーは150 MJ m⁻³である）。

【0044】

（B. 粘性系）

FL腺により生成される粘性系は、粘性のクモの巣を形成する。粘性系をコードする遺伝子は未だに同定されていない。粘性系は、5容量%未満の結晶を含み、そのネイティブな状態で可塑性であり、そしてライクラに類似する特性を有する。

粘性系は、以下の特徴を有する：軽度架橋ゴム（例えば、スパンデックス）に機械的に類似する、低剛性（初期ヤング率が3 MPaである）、そして非常に伸長可能である。

【0045】

（C. 菌糸）

CY腺は、カイコ（*B. mori*）によって生成される菌糸に類似する菌糸を生成する。

【0046】

（III. 生体フィラメント遺伝子の合成）

ネイティブな系遺伝子をクローニングする際に遭遇する困難性のために、合成遺伝子はクローニングおよび発現され得る。今日までにクローニングされたcDNA配列は、全体の構成および配列保存領域において類似性を共有する。コンセンサス反復は、グリシンおよびグルタミンが豊富であり、ポリ（A）領域はより大きな反復単位へと統合される。

【0047】

考察の目的のために、候補遺伝子は、*N. clavipes*由来の主要なドラグライン遺伝子の1つであるスピドロイン1（Arcidiaconoら, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:31-38, 1998）により示される。これらの遺伝子の高反復性は、遺伝子の安定性および組換えの可能性に関する懸念を生じる。反復は、例えば、Arcidiaconoら

, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 31-38, 1998; FahnestockおよびIrwin (前出) によって提供される示唆に基づいて回避し得る。さらに、一連の構築物は、類似のストラテジー (FahnestockおよびIrwin, Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 23-32, 1997) を用いて生成され得、4~20 (またはそれより多くの) 連続した反復を生成し、そしてトランスジェニック動物の作製前に細胞株において試験され得る。合成反復のブロックは、コードされる生体フィラメントの転写を容易にするため、および発現を増強するように、異なるサイズを有し、そして非コード配列 (例えば、カゼイン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子由来のイントロン) を含むように構築される。このブロックは、頭-尾構築物ストラテジー (McGrath, K. P. 博士論文, University of Massachusetts at Amherst, 1991; Ferrariら, 米国特許第5, 243, 038号) を用いて交互であり得る。

【0048】

コドン選択はまた、発現を最大にするために設計され得る。なぜなら、この遺伝子が、より少ない量で細胞中に存在するtRNA種によって認識される、より多数のコドンを含む場合、成熟前終結が生じ得るからである (Rosenbergら, J. Bacteriol. 175: 716-722, 1993, Manley, J. Mol. Biol. 125: 407-432, 1978)。発現されるべき遺伝子は、発現される組織において有利なコドンを用いて設計および合成される (すなわち、乳腺におけるカゼイン遺伝子; 膀胱におけるウロプラキン (uroplakin))。

【0049】

生体フィラメントタンパク質におけるアラニン残基の高い頻度を考慮に入れると、細胞株の細胞培養培地に、さらなるalaおよび/またはglyアミノ酸を補充して、この生体フィラメントタンパク質を生成するための律速段階であるAla tRNAおよび/またはGly tRNAプールの欠乏を防ぐことが所望され得る。

【0050】

(I V . 発現ベクターのアセンブリ)

このようなタンパク質をコードする核酸分子についてトランスジェニックな動物の乳汁または尿におけるタンパク質（例えば、生体フィラメントタンパク質）の合成および分泌を駆動する真核生物発現ベクターが、生成され得る。これらのベクターは、標準的な分子生物学の技術に従って調製される。

【0051】

合成された核酸分子は、コードされたポリペプチドの容易な同定および／または精製のために結合されたエピトープタグをコードする配列を有し得る。このような精製は、例えば、エピトープタグについてのアフィニティークロマトグラフィーによって達成され得る。部位特異的タンパク質分解剤または化学的薬剤の認識部位は、配列に付加されて、エピトープタグ化ポリペプチドの精製後のエピトープタグの除去を容易にし得る (Saitoら, J. Biochem. 101: 123-134, 1987)。好ましくは、部位および部位特異的タンパク質分解剤は、エピトープタグと生体フィラメントタンパク質との連結部で、または連結部付近で切断する。

【0052】

種々の化学的切断剤およびそれらの認識部位（一文字コードで）が当該分野で公知であり、そして以下を含む：ヒドロキシルアミン（NまたはG）；蟻酸（DまたはP）、臭化シアン（M）；または酢酸（DまたはP）。例えば、臭化シアン（CNBr）を用いて、エピトープタグと生体フィラメントタンパク質との間に導入されたMet（M）残基を切断し得る。

【0053】

あるいは、天然のまたは合成のプロテアーゼが用いられ得る。これら（およびそれらの認識部位）の例としては、エンテロキナーゼ（DDDK；配列番号5）；第Xa因子（IEGR；配列番号6）；キモトリプシン（WおよびYおよびF）；レニン（YIHPFHL；配列番号7）；トリプシン（RおよびK）；ならびにトロンビン（RGPR；配列番号8）が挙げられる。例えば、エピトープタグは、トロンビン認識部位を介して生体フィラメントに結合され得る。エピト

ーブタグ含有タンパク質のアフィニティー精製後、生体フィラメントは一般にタンパク質分解に耐性であるので、このエピトープタグを、トロンピンでのタンパク質分解性切断によって容易に除去し得る。

【0054】

発現カセットは、所望の真核生物細胞における適切な転写、翻訳、および分泌のために必要なエレメント（すなわち、プロモーター、分泌シグナル配列、イントロン配列、およびポリアデニル化シグナル）からなる。多くの乳汁または尿特異的プロモーターが、それらのシグナル配列と共に、または糸および／もしくはフィブリン遺伝子シグナル配列と共に用いられ得る。前者の場合、生体フィラメントをコードする核酸分子は、それ自体の翻訳開始コドンを含まないべきであり、むしろ、シグナル配列の3'末端とインフレームであるべきである。生体フィラメントをコードする核酸分子の3'末端は、それ自体のポリアデニル化シグナルを含み得るか、またはプロモーターおよび／もしくはシグナル配列について用いられる遺伝子において通常見られる3'非翻訳配列を含み得る。例えば、生体フィラメントをコードする核酸分子は、全て同じカゼイン遺伝子由来のプロモーター、シグナル配列、および3'非翻訳配列を有する発現ベクターカセット中で存在し得る。

【0055】

用いられるべき真核生物発現構築物は、以下の1つ以上の基本成分を含み得る。

【0056】

（（A）転写開始調節領域のプロモーター）

これらの配列は、改変されるべき細胞に対して異種性であり得、そして作動可能に連結された核酸分子の強力なレベルの転写を付与する、合成および天然のウイルス配列（例えば、ヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーター（CMV）；シミアンウイルス40初期プロモーター（SV40）；ラウス肉腫ウイルス（RSV）；またはアデノウイルス主要後期プロモーター）を含み得る。プロモーターはまた、重要でない配列の欠失および／もしくは配列（例えば、エンハンサー（例えば、エンハンサーエレメントCMV、SV40、またはRSV））の付

加、またはこのような配列の縦列の反復によって改変され得る。強力なエンハンサーエレメントの付加は、転写を10～100倍増加させ得る。上記のウイルスプロモーターからの発現は構成性である（すなわち、発現は見かけの外部刺激の非存在下で生じる）。

【0057】

あるいは、乳汁における発現については、例えば、プロモーター領域は、反芻動物乳腺種遺伝子に対してネイティブであり得る。例としては以下が含まれる： α S1-カゼイン（PCT出願番号第WO91/08216号および同第WO93/25567）、 α S2-カゼイン、 β -カゼイン（Rosen, J. M., 米国特許第5,304,489号；Leeら, *Nucleic Acids Res.* 16:1027-1041, 1988）、 κ -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、および α -ラクトアルブミン（Vilotteら, *Eur. J. Biochem.* 186:43-48, 1989；PCT出願番号第WO88/01648号）。これらのプロモーターは、種々のタンパク質の高レベルの発現を、組織および乳汁分泌特異的様式で駆動し得る。

【0058】

（（B）イントロンを含むこと）

イントロン（すなわち、ゲノムクローン）を含む遺伝子は、イントロンを含まない遺伝子よりも高いレベルで発現される。それゆえ、転写開始部位と翻訳開始コドンとの間に、翻訳停止コドンに対して3'側に、または生体フィラメントをコードする遺伝子のコード領域の内側に配置されたイントロンを含むことは、より高いレベルの発現を生じ得る。

C

【0059】

イントロン配列は、5'スプライス部位（ドナー部位）および3'スプライス部位（アクセプター部位）を含む。少なくとも100塩基対の配列が、これらの2つの部位の間に見出される。これらのイントロン性（intronic）配列の起源は、用いられるプロモーターに由来するか、またはネイティブな遺伝子（IchimuraおよびMita, *J. Mol. Evol.* 35:123-130, 1992）に由来し、そして糸遺伝子またはフィブロイン遺伝子のコード配

列の5'側に配置される。この構築物の非常に反復的な性質は、この遺伝子の安定性および反復配列に起因した組換えの可能性についての懸念を生じるので、これらは、このプロモーターを用いる遺伝子のイントロンを挿入することにより破壊され得る。このイントロンは、*Bombyx mori*のフィブロイン遺伝子において存在するイントロン (TsujimotoおよびSuzuki, Cell 118: 591-600, 1979; TsujimotoおよびSuzuki, Cell 116: 425-436, 1979) と類似の様式で配置され得る。この戦略は、この遺伝子の増加した安定性に加えて、増加したレベルの発現を可能にする。

【0060】

(C) シグナル (リーダー) 配列

各発現ベクターは、発現された遺伝子産物を、乳腺細胞または尿上皮 (uroepithelial) 細胞から分泌されるように導くシグナル配列を含む。このシグナル配列は、天然で分泌される任意の遺伝子において存在する。相対的なフィブロイン遺伝子 (例えば、*B. mori*の重フィブロイン遺伝子および軽フィブロイン遺伝子、P25およびssp160) 由来のシグナル配列、発現組織に特異的な遺伝子 (例えば、カゼイン遺伝子またはウロブラキン遺伝子) 由来のシグナル配列、または一般的なシグナル配列 (例えば、ヒトアルカリホスファターゼ、メリチン (melittin)、およびCD33シグナルペプチド) が用いられ得る。さらに、分泌シグナル配列が、哺乳動物/昆虫遺伝子間で交換され得る; 例えば、メリチン、カゼイン由来のシグナル配列、または (蛛形類からの) ネイティブな糸遺伝子もしくは (昆虫からの) フィブロイン遺伝子由来の配列が用いられ得る。

【0061】

(D) 終結領域

核酸構築物の転写終結領域は、5'プロモーター領域が由来する3'末端およびポリアデニル化シグナルを含み得る。例えば、ウシ α S1カゼイン遺伝子。あるいは、核酸構築物の3'末端は、転写終結シグナル、および翻訳後mRNAの安定性を調節することが公知であるポリアデニル化シグナル (例えば、ウシ成長

ホルモン、 β グロビン遺伝子、またはSV40初期領域由来のポリアデニル化シグナル)を含む。

【0062】

((E) 発現ベクターの他の特徴)

遺伝子移入のために設計された発現ベクターはまた、*E. coli*中での増殖のための複製起点、SV40複製起点、アンピシリン耐性遺伝子、真核生物における選択のためのネオマイシン耐性遺伝子、ならびに／または優性選択マーカールおよび目的の遺伝子を増幅する遺伝子(すなわち、デヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子)を含む。さらに、発現ベクターは、形質導入細胞における増強された組み込み率を可能にする適切な隣接配列(ITR配列; Lebkowskiら, *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996, 1988)を、その5'末端および3'末端に含み得る。さらに、インビトロでの糸タンパク質またはフィブリンタンパク質の長期発現は、自律複製を可能にする配列(すなわち、エプスタインバーウイルスからのEBNA-1およびoriP)の使用により達成され得る(形質導入された環状核酸は、哺乳動物細胞においてプラスミドとして複製する)。

【0063】

DNAの大きなセグメントをクローニングおよび増殖させるためには、コスミドが選り抜きのベクターである。プラスミドベクターは、理論的には、大きな挿入片を保有し得るが、得られる組換え体は、*Escherichia coli*を非常に非効率的に形質転換する。コスミドは、大きな外来DNA片を増殖させる能力を有する(Royalら, *Nature* 279:125, 1979)。

【0064】

トランスジェニック動物の作製のために用いられる発現ベクターは、細胞の形質転換の前に、制限エンドヌクレアーゼの消化によって線状化され得る。この方法の変法では、例えば、ウシカゼイン配列または成長ホルモン配列に由来するコード配列、5'末端調節配列(例えば、プロモーター)、および3'末端調節配列(例えば、3'非翻訳領域)を含む消化フラグメントのみを用いて、細胞を形質転換する。このようなフラグメントで形質転換された細胞は、結果として、細

菌における単なるプラスミド増殖のために必要な任意の配列（例えば、細胞は、*E. coli* の複製起点も、原核生物細胞を選択するために有用である抗生物質耐性タンパク質（例えば、アンピシリン耐性タンパク質）をコードする核酸分子も含まない）を含む。

【0065】

本方法の別の変法では、細胞を形質転換するために用いられる消化フラグメントは、コード領域、5' 調節配列および3' 調節配列、ならびに真核生物細胞を選択するために有用な抗生物質（例えば、ネオマイシンまたはピューロマイシン）に対する抵抗性を付与し得るタンパク質をコードする核酸分子（プロモーターおよび3' 非翻訳領域を含む）を含む。

【0066】

目的の生体フィラメント遺伝子は、発現を優先的に改善するために、その5' 非翻訳領域（UTR）、その3' UTR、および／またはN末端をコードするその領域において改変され得る。あるいは、生体フィラメントをコードする核酸分子のコード配列内の配列を欠失または変異させて、分泌を増加させ得るかおよび／または例えば、小胞体（ER）残留シグナルまたは他の選別阻害シグナルの存在に起因する細胞内での遺伝子産物の残留を回避し得る。さらに、トランスジェニック構築物は、クロマチン開口（opening）ドメイン活性を保有する配列を含み得、その結果、これらは、連結された導入遺伝子の組織特異的発現の再現性のある活性化を付与する（Ellisら、PCT出願第WO95/33841号；ChungおよびFelsenfield、PCT出願第WO96/04390号）。

【0067】

（V. 発現ベクターの試験および特徴付け）

アセンブルした構築物は、2片のDNAが連結によって一緒に融合された領域を配列決定することにより部分的に特徴付けられる。部分的制限エンドヌクレアーゼマップは、生体フィラメントをコードする核酸分子に関して、連結された調節配列の正確な方向についての情報を提供する。

【0068】

アセンブルされた構築物の機能性についてのさらなる特徴付けは、樹立された乳腺上皮細胞株（例えば、MAC-Ts）（TurnerおよびHuynh, 米国特許第5, 227, 301号; Huynhら, Exp. Cell. Res. 197:191-199, 1991; Stampferら, 米国特許第4, 423, 145号を参照のこと）へのそれらのトランスフェクション、および分泌産物の同定を含む。

【0069】

本発明の実施において使用される組換えDNA方法は、分子生物学の分野の当業者に周知である標準的な手順であり、そして例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版), Cold Spring Harbor Press, 1989; Ausubelら Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1994; ならびにPerbal, B. V., A Practical Guide to Molecular Cloning (第2版), John Wiley & Sons, New York, NY, 1988に詳細に記載される。説明の目的のみで、以下の実施例において用いられる生体フィラメント遺伝子は、Arcidiaconoら, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:31-38, 1998によって記載およびクローニングされた1.5 kbのNcDS-1挿入片である。

【0070】

以下の実施例は、本発明の例示を意味し、そして本発明を限定しない。

【0071】

(実施例1: カゼインプロモーター)

以下の実施例では、構築物の設計は、ヤギ β -カゼインプロモーター (Ebertら, Bio/Technology 12:699-701, 1993)、続いてそれ自体の発現のためのシグナル配列、続いてカゼイン遺伝子の5'末端および3'とインフレームの系クローン (Arcidiaconoら, 前出) を

含む1.5 kbの挿入片の使用を含む。この構築物の模式図を図1 Aに示す。

【0072】

生体フィラメントをコードする核酸分子（例えば、糸遺伝子もしくはフィブロイン遺伝子、またはそれらのフラグメント）を、カゼインプロモーターに融合し、そして生体フィラメントタンパク質の分泌を、プロモーターが由来する遺伝子または発現されるべき生体フィラメントの核酸分子からのシグナル配列によって駆動する。終結配列は、生体フィラメント遺伝子自体またはプロモーター遺伝子から由来し得る。さらに、ハイブリッド遺伝子を、発現のレベルを増加させるために作製し得る。この目的のために、糸遺伝子もしくはフィブロイン遺伝子（またはそれらのフラグメント）を、ヤギ β カゼイン遺伝子（Ebertら、*Bio / Technology* 12:699-701, 1993）のエキソン2（ATGのすぐ上流）とエキソン7（停止コドンの下流）との間に導入し得る。構築物の高反復性は、遺伝子の安定性および反復配列に起因する組換えの可能性に関する懸念を生じるので、カゼイン遺伝子由来のイントロン（イントロン3～7）を挿入することによってこれらを破壊し得る。大きなサイズの最終構築物またはプラスミドの骨格が、*E. coli* 宿主におけるその増幅のために必要な配列（Sambrookら、前出）を含む任意の公知の細菌ベクター（好ましくは大きなDNAサイズを受け入れる細菌ベクター）からなり得ることに起因して、ベクターの構築は、コスミドベクター（*super cos*）において実施し得る。

【0073】

（実施例2：乳清酸性タンパク質（WAP）構築物）

本実施例は、WAP遺伝子プロモーター、そのシグナル配列、ドラグライン糸をコードする1.5 kbのcDNA（Arcidiaconoら、前出）、続いてWAP遺伝子の3'末端（Velanderaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:12003-12007, 1992）から構成されるハイブリッド遺伝子の作製を実証する。その構築の詳細を以下に記載し、そして図1 Bに図示する。

【0074】

乳清酸性タンパク質（WAP）は、げっ歯動物における主要な乳清タンパク質

であり、妊娠後期および乳汁分泌期に乳腺において独占的に高レベルで発現される (Hobbsら, J. Biol. Chem. 257: 3598-3605, 1982)。ゲノムマウスWAP遺伝子は、2.6 kbp (キロ塩基対) の5' 隣接プロモーター配列、3.0 kbp のコード配列 (エキソンおよびイントロン)、ならびに16 kbp の3' 隣接DNA (図1Bを参照のこと) (Velanderaら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 12003-12007, 1992; Velanderaら, Ann. N. Y. Acad. Sci. 665: 391-403, 1992) からなる。

【0075】

1つの実施例では、WAP遺伝子プロモーターおよびドラグライン系をコードするcDNAから構成されるハイブリッド遺伝子が構築され得る。ハイブリッドドラグライン系をコードする遺伝子は、目的の遺伝子または核酸分子 (この場合、ドラグライン系をコードするcDNA) を、5' 末端のマウスWAPプロモーターおよび5' 配列 (ヌクレオチド-949位~+33位) と、3' 末端のWAP 3' 配列 (843bp; エキソン3の部分、少なくとも30塩基、ならびにイントロンC、エキソン4、および70bpの3' UTRの全て) との間に挿入することにより作製する (Campbellら, Nucleic Acids Res. 12: 8685-8697, 1984)。本実施例では、シグナル配列は、ネイティブな系遺伝子に由来する。さらなる56bpを5' 末端 (-949位~+89位) に含めることにより、WAP遺伝子のシグナル配列もまた用い得る。

【0076】

別の実施例では、ハイブリッド遺伝子は、マウスWAP遺伝子からの5' 非翻訳領域の一部および19アミノ酸のシグナル配列をコードするヌクレオチド配列 (ヌクレオチド+1~+90) (Hennighausenら, Nucl. Acids Res. 10: 3733-3744, 1982) を挿入し、そしてKpn I制限エンドヌクレアーゼ認識部位に隣接したシグナル配列をコードする90bp (塩基対) の配列を含む5' プライマーを用いて1.5kb (キロベース) の系遺伝子 (NsDS-1; Arcidiaconoら, 前出) を増幅すること

により作製される。増幅を行って、正確なリーディングフレーム、およびこの遺伝子の3'末端にKpnI制限エンドヌクレアーゼ認識部位を作製する3'プライマーを維持する。次いで、このPCR産物を、WAPの第1エキソンのKpnI部位に挿入する。ハイブリッド遺伝子を、EcoRI制限エンドヌクレアーゼを用いる消化によってベクターから切り出し得（図1Bを参照のこと）、そしてマイクロインジェクションのために精製し得る。

【0077】

（実施例3：ウロプラキンIIプロモーター）

これらの実験において、ウロプラキンIIプロモーター（Linら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:679-683、1995；Sun, T.、PCT出願番号：WO96/39494）を、トランスジェニック動物の尿路上皮における糸遺伝子のフィブロインの発現を駆動するために使用する。フィブロインまたは糸遺伝子を、マウスウロプラキンII（UPII）遺伝子（Linら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:679-683、1995）の3.6kbの5'隣接配列の下流に挿入する。マウスプロタミン-1（Mp-1）遺伝子（Peschonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:5416、1987）のエキソン1の一部ならびにイントロン1およびエキソン2の全部を含む配列を、この遺伝子の3'末端に配置し、エキソン/イントロンスプライシング部位およびポリアダニル化シグナルを提供する。当業者はまた、フィブロインもしくは糸コード遺伝子、またはそれらのフラグメント（成熟タンパク質のみ）を、エキソン3のアミノ酸59にインフレームで挿入することによって、ウロプラキンII遺伝子のシグナル配列を使用し得る。この構築物の線図を図1Cに示す。

【0078】

（実施例4：DNAシャッフリング）

生体フィラメントをコードする遺伝子カセットを作成するための別の方法は、DNAシャッフリングによる。DNAシャッフリングは、関連遺伝子のプールのランダムフラグメント化、続いてプライマーレスPCRによるフラグメントのアセンブリにより実施される、組換えおよび変異のためのプロセスである（Ste

mmerr, W. P. Nature 370:389-391, 1994; Stemmer, W. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:10747-10751, 1994)。DNAシャッフリングの目標は、どの遺伝子産物が律速であるかをまず決定することなく遺伝子の機能を最適化することである。遺伝子自体が「シャッフルされ」得るか、または異なる種由来であり得る（すなわちスピドロイン1および2ならびにADF1~4）。さらに、1種内の異なる反復（例えば、ADF3由来のGGAGQGGY（配列番号4））が「シャッフルされ」得（例えば、ADF1、2、および4由来の反復を用いる）、そして好ましい特性を生じる組み合わせを決定するために発現される。点変異に加えて、多様性が、広範な種々の変異機構（例えば、ポリヌクレオチド欠失、挿入、および逆位、ならびに組み込みおよび切除）を用いて生成される。一旦このように生成されると、生体フィラメントコード核酸分子は、乳汁または尿における分泌のための発現カセットに挿入され得、そして哺乳動物細胞を形質転換するために使用され得る。

【0079】

（実施例5：2つの遺伝子を発現する構築物）

2つの遺伝子の発現（例えば、ドラグライン系は、ある比のADF3および4からなる）について、2つの別個の構築物が生成され得るか、または両方の遺伝子が、介在するリボソーム侵入部位（IRES）の挿入を有する同じ発現カセット中にクローニングされ得るかのいずれかである（Jangら、J. Virol. 62:2636-2643, 1988）。両遺伝子を同じ発現カセット中にクローニングすることの利点は、1つの単独の構築物のみがトランスジェニック動物を作製するために必要とされることである。

【0080】

（実施例6：キメラまたはハイブリッド生体フィラメントの合成）

コラーゲンまたはフィブリリンの1つ以上のドメインとインフレーション系の融合（結晶ドメインまたは非結晶ドメインのいずれかを含む）を含むキメラ分子が、合成される。これは、架橋、安定性、または弾性の増大を可能にし得る。このようなキメラは、手術用生体材料として特に有用である。

【0081】

(実施例7：乳腺上皮または尿路上皮細胞株における生体フィラメントの產生)

本発明の合成された生体フィラメントコード核酸分子は、同種の生物学的関連細胞培養系において產生される。従って、合成遺伝子の遺伝子安定性、分泌安定性および產生された生体フィラメントの特性が、トランスジェニック動物研究が開始される前に非常に効率的に評価され得る。

【0082】

乳腺上皮および尿產生細胞株を、標準的な技術（例えば、Ausubelら、前出を参照のこと）に従って、それらの代表的なプラスミドを用いてトランスフェクトする（例えば、乳汁特異的プロモーター含有発現構築物を、乳腺上皮細胞にトランスフェクトする）。1つの例において、產生されたクモ系の分泌を実証するために、培養培地を安定な細胞株から採取し（乳腺上皮細胞の分化24～96時間後）、そして抗クモ系抗体（Monsanto、St. Louis、MOから市販）または配列番号1～4に相同な配列を有するペプチドに対して惹起された抗体を用いるウェスタンブロット分析のためにSDS-PAGEにより分離する。

【0083】

(MAC-Tにおける可溶性ADF-3モノマーまたはサブユニットの発現および分泌)

以下のアプローチを、MAC-T細胞においてADF-3細胞を発現および分泌させるために採用した。ADF-3の2.0kb cDNAクローン（Guertteら、1996、Science 272巻；112）を、構築物特異的プライマーを使用してPCRによって増幅した（プライマー1：CGTACGAAGCTTACGCACGAGCCGGATCTG、プライマー2：ATTAACTCGAGCAGCAAGGGCTTGAGCTACAGA）。次いで、PCR産物を、SfiIおよびXhoIで制限消化し、そしてまたSfiIおよびXhoIで制限消化した哺乳動物発現ベクターpSecTag（Invitrogen；図1）に連結した。発現ベクターは、強力プロモーター（CMV、サイ

トメガロウイルス)、シグナル配列(マウスIg- κ)および「TAG」(mycおよびHis配列)を構築物の3'末端に含む。SV40プロモーターにより駆動されるハイグロマイシンB耐性遺伝子は、構築物の骨格に存在する。pSecTagから発現されるタンパク質を、タンパク質分泌のためにマウスIg- κ 鎖リーダー配列にN末端で、ならびに検出および精製のためにc-mycエピトープおよび6つの縦列のヒスチジン残基を含むペプチドにC末端で融合する。発現構築物(pSecTag/ADF-3)をリポフェクションによりMAC-T(乳腺上皮細胞、特許第5,227,301号)にトランスフェクトし、そして馴化培地を、「TAG」特異的抗体(抗-myc抗体、Invitrogen)を使用してADF-3の存在について試験した。

【0084】

簡潔には、ウシ乳腺上皮細胞を、100mmディッシュ当たり 5×10^5 細胞の密度で播種した。翌日に、細胞をpSecTag/ADF-3プラスミドまたはADF-3 cDNAを含まないコントロールベクターでトランスフェクトした。10 μ gのプラスミドDNAを、0.25mlのDMEMに希釈し、そして等量のリポフェクタミン(0.25ml DMEM中20 μ gの脂質)と混合した。この混合物を10秒間ボルテックスにかけ、そしてこの複合体を室温で30分間形成させた。容量をDMEMで4mlに増加させ、そして脂質-DNA混合物を細胞に適用し、そして37°Cで16~20時間インキュベートさせた。次いで、細胞を別に24時間、10%FCSおよび5 μ g/mlインシュリンを含む新鮮な培地中で培養した。続いて、細胞を、50 μ g/mlハイグロマイシンBを含む同じ培地中で選択した。耐性コロニーを、14日後に単離した。MAC-T/ADF-3トランスフェクト体由来の馴化培地を、無血清培地中でのインキュベーション24時間後に採取し、Ni-NTAアガロースビーズ(Qiagen)とインキュベートした。このビーズは、タンパク質のCOOH末端に存在し、そして培地からのタンパク質の精製を可能にする(His)⁶に選択的に結合する。アガロースビーズからの溶出されたタンパク質材料を、10%SDS-PAGEゲル上にロードし、電気泳動し、ニトロセルロース膜上に移し、そしてモノクローナル抗myc抗体(1:5000希釈)を用いてプロットした。

【0085】

(結果)

pSecTag/ADF-3でトランスフェクトしたMAC-Tの培地のウェスタンブロット分析は、myc抗体と強く交差反応するバンドの存在を明らかにした。これは、78kDa分子量マーカーのちょうど下に移動する。これは、ADF-3融合タンパク質の予想サイズである(677 $\alpha\alpha$; 60.8kDa)。myc抗体の使用はまた、mycエピトープでタグ化されたポジティブコントロールタンパク質についての約40kDaの予想サイズのバンドを示した(ポジティブコントロール; レーン2)。交差反応バンドは、ネガティブコントロールとして使用したベクター(pSecTag)を有する細胞からの培地を用いるレーンでは予想されるように観察されなかった(レーン3)。

【0086】

(可溶性ADF-3サブユニットの大規模産生)

組換えADF-3タンパク質を産生するために、上記実施例Iからの安定な株を、最も高い発現体についてウエスタン分析によってスクリーニングした。最も高い発現体クローンを選択し、そして2つの中空ファイバーバイオリアクターに播種するために使用した。1つのシステムは、0.5m²中空ファイバーリアクターであり、そして第二のシステムは、3.25m²リアクターを有するCell-Pharm System 2000である。簡潔には、102の三連フラスコ(MAC-T/ADF-3細胞を70%コンフルエンスで含む)を、トリプシン処理し、そして3.25m²リアクター(8 \times 10⁸細胞)に播種するために使用した。0.5m²リアクターを、同様の様式であるが2 \times 10⁸細胞で播種した。本発明者らは、ウエスタンブロット分析により5 μ l容量の培地を分析し、ADF-3タンパク質バンドが存在することを示すことにより0.5m²リアクターから連続して毎日採取したものにおけるADF-3の産生および分泌の一貫性を示した。これらの培地は、少なくともmg量での可溶性のサブユニット形態の精製のために使用され得る。

【0087】

(Ni-NTAカラムアフィニティー精製を用いる細胞培養培地からのADF

- 3タンパク質の精製)

ADF-3材料を分泌するMAC-T細胞由来の培地を、BioRad BioLogic LP機器上のNi-NTA Superflow樹脂によって精製した。簡潔には、培地をカラム上に結合させ、ADF-3タンパク質の捕捉を可能にした。この樹脂を、緩衝液A (Tris-HCl 50mM pH8.0 およびNaCl 0.3M) で洗浄した。結合タンパク質を、250mMまたは100mMのいずれかのイミダゾールを添加した洗浄緩衝液Aを用いて溶出した。

【0088】

(精製ADF-3材料の特徴付け)

(銀染色)

Ni-NTAカラムからの溶出タンパク質画分を、4~20%Tris-Glycineゲル (Novex) 上で分離し、続いてBio-Rad銀染色キットを用いて染色した。これは、Merrillら (1981) の方法に由来する。サンプルを、1 μ gの材料と12Mの尿素とを一緒に6Mの最終濃度になるまで混合し、そして10% β -メルトプトエタノールを含む緩衝液をロードし、そしてロード前に95°Cで5分間加熱することにより調製した。約61kDaの分子量を有するADF-3精製材料は、80%より高い純度であった。

【0089】

(ウェスタンブロッティング)

ウェスタンブロット分析を、8~16%Tris-Glycineゲル (Novex) アフィニティーカラムから溶出された材料を分離し、次いでHybond ECLニトロセルロース膜 (Amersham) に電気転写し、そしてmycペプチドに対するモノクローナル抗体 (1/5000希釈; Invitrogen、カタログ番号R950-25) と反応させすることにより行った。免疫複合体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と結合体化させた抗マウスIgGを用いて可視化した。分子量約61kDaを有する強い交差反応バンドが明らかであった。これは、ADF-3のcDNA配列から推定された分子量と一致する。

【0090】

(実施例V：乳汁特異的プロモーター、マウス乳清酸性タンパク質 (WAP) により駆動されるADF-3の発現)

ADF-3の乳汁特異的発現を可能にする発現ベクターを構築した。発現は、乳清酸性プロモーター (WAP、4.4 kb; Dr. L. Henningsen) により駆動される。カセットはまた、2コピーの隔離体エレメント (insulator element) (ニワトリ β -グロビン遺伝子座由来; Nature 1990、348巻、749頁) を含む。発現ベクターを生成するために、以下の工程を行った：

工程1：隔離体配列のPCR増幅：隔離体フラグメントを、隔離体特異的プライマーを用いるニワトリDNAのPCR増幅から誘導した

(プライマー1：TTTTGCGGCCGCTCTAGACTCGAGGGGGA
CAGCCCCCCCCCAAAG、

プライマー2：TTTTGGATCCGTCGACGCCCCATCCTCAC
TGA CTCCGTCTGGAGTTG)。

PCR産物を、2つの別個の反応において制限消化した。1つは、Not IおよびXho Iを用い、そして第二のチューブは、BamH IおよびSal Iを用いる。次いで、この2つの制限消化されたフラグメントと一緒に連結し、いずれかの末端にNot I部位およびBamH I部位を有する2 kbの隔離体フラグメントを生成した。

工程2：WAP 3' 非コード配列のPCR増幅：WAP 3' 末端を、マウスDNAおよび以下のプライマーを使用することによりPCR増幅した：

プライマー1：TTTCTGATAACCCTTCAGTGAGCAGCCGG
C；

プライマー2：AATTGGTACCAGCGGCCGCTCTAGAGGAA
CTGAAGCAGAGACCATGC。

次いで、PCR産物をPme IおよびNot Iで制限消化した。

工程3：WAP 4.4 kb プロモーター配列の隔離体フラグメントとの連結。

bluescriptプラスミドに存在する4.4 kbのWAPプロモーターを

SacI IおよびNotIで制限消化し、そしてリンカー（プライマー1：ggactagttgatcagcggcgctataggatcc；プライマー2：ggcctggatcctatagcggcgctgatcaactagtccgc）を挿入し、4.4kb WAPプロモーターおよびさらなる制限部位（SacI I、SpeI、BclI、NotI、およびBamHI）を有するベクターを生成させた。次いで、この新規なベクターをNotIおよびBamHIで制限消化し、そして隔離体フラグメントに連結した（工程1を参照のこと）。

工程4：WAP 3' 非コード配列のADF-3配列との連結。bluescriptベクターをKpnIおよびSacI Iで制限消化し、そしてリンカー（プライマー1：ggaccgggtgttaacgatattctctagagcggccgct；プライマー2：ccggagcggcgctctagagatatcgtttaacaccgggtccgc）を挿入し、さらなる制限酵素部位（KpnI、NotI、XbaI、EcoRV、HpaI、AgeI、およびSacI I）を生成させた。次いで、このベクターをEcoRVで制限消化し、そしてADF-3フラグメント（pSecTag/ADF-3の制限消化、図1、NcoIを用いる）を平滑末端化し、そしてこのベクターに連結した。続いて、この新規なベクターをPmeIおよびNotIで制限消化し、そして1.6kbの3' WAP遺伝子のPCR産物（工程2を参照のこと）を挿入した。次いで、このベクターを、SacI IおよびAgeIで制限消化し、ADF-3遺伝子上流を線状化し、そして隔離体およびWAPプロモーターを含む6.8kbのフラグメント（これは、SacI IおよびAgeIで工程3からのベクターを制限消化することによって生成された）と一緒に連結した。最終構築物は、二量体化されたニワトリβ-グロビン遺伝子の隔離体、続いてWAP 4.4kbプロモーター、ADF-3遺伝子およびWAP 1.6kb 3' 非コード領域（pWAP/ADF-3）を含む。この構築物の機能性は、HC11細胞（マウス乳腺上皮細胞）におけるトランスフェクションおよび誘導によって示されている。簡潔には、HC11細胞を100mmディッシュ当たり 5×10^5 細胞の密度で播種した。翌日、細胞を、WAP/ADF-3プラスミドまたはADF-3 cDNA

を有さないベクターでトランスフェクトした。10 μ gのWAP/ADF-3プラスミドDNAを、0.25 mlのDMEMに希釈し、そして等容量のリポフェクタミン (0.25 ml DMEM中20 μ gの脂質) と混合した。この混合物を10秒間ボルテックスにかけ、そしてこの複合体を室温で30分間形成させた。この容量をDMEMで4 mlに増加させ、そして脂質-DNA混合物を細胞に適用し、そして37°Cで16~20時間インキュベートさせた。次いで、細胞をさらに24時間、10% FCSおよび5 μ g/mlインシュリンおよび10 ng/mlのマウスEGFを含む新鮮な培地 (培地A) 中で培養した。続いて、細胞を、50 μ g/mlハイグロマイシンBを含む同じ培地中で選択した。耐性コロニーを、7日後にプールした。WAPプロモーターから発現を誘導するために、細胞を分化させる必要がある。以下のプロトコルに従った。安定な細胞プールを、マトリゲルの薄層でコーティングした6ウェルディッシュ中に 3×10^5 細胞の密度でプレートした。培地A中でコンフルエンスを達成した後 (2日後)、細胞を、培地からEGFを除去することにより感作し、そして48時間後、乳腺刺激ホルモンを培地 (すなわち、0.1 μ Mデキサメタゾンおよび1 μ g/mlヒツジプロラクチン) に添加した。ホルモン処理の48時間後、培地を除去し、Ni-NTAアガロースビーズ (Qiagen) とインキュベートした。このビーズは、タンパク質のCOOH末端に存在し、そして培地からのタンパク質の精製を可能にする (His) ₆ に選択的に結合する。アガロースビーズからの溶出されたタンパク質材料を、8~16% Tris-Glycineゲル (NOVE X) 上にロードし、電気泳動し、ニトロセルロース膜上に移し、そしてモノクローナル抗myc抗体 (1:5000希釈) を用いてプロットした。全ての実験を、三連で行った。コントロールとして、同様のウェルを、乳腺刺激ホルモンを存在させずに同じ条件下でインキュベートした。さらに、ベクター中にADF-3のないWAPベクターでトランスフェクトした細胞をネガティブコントロールとして使用した。乳腺刺激ホルモンの存在は、マトリゲル上でWAPプロモーターからのADF-3の発現を刺激し、そして乳腺特異的発現カセットの機能性を立証する。予想されるように、ネガティブコントロールの交差反応バンドは観察されなかった。

【0091】

(実施例8：乳汁または尿中で生体フィラメントを発現するトランスジェニック動物の生成)

(WAP/ADF-3トランスジェニックマウスの作製)

上記構築物を、標準的な技術に従ってトランスジェニックマウスを作製するために使用した。7匹の創始体(3匹の雌および4匹の雄)をPCR分析によってポジティブであると同定した。Amersham Pharmacia Ready-to-Go PCRビーズを用いて、1 μ Mの濃度の10 μ lの各プライマー(プライマー1：GTTGTATCGGCCCTGGTATCTAT プライマー2：ATGTTCTCTCTGGATCCAGGAGTGAAGG)を、5 μ lのDNA(100ngを含有する)と混合し、そして10 $^{\circ}$ Cのブロック温度で設定したPCR機器に配置した。1つのReady-to-Go PCRビーズを各チューブに添加し、チューブをキャップ留めし、そしてサイクルを開始させた。使用したサイクルは、以下の通りであった：工程1 95 $^{\circ}$ Cで10秒間；工程2 60 $^{\circ}$ Cで30秒間；工程3 72 $^{\circ}$ Cで30秒間；工程4：工程1から3を34サイクル繰り返す。工程5：72 $^{\circ}$ Cで7分間。工程6：4 $^{\circ}$ C。PCRサイクルの終了時に、サンプルを、2%アガロースゲル上の電気泳動によって309bpのPCR産物の存在について分析する。

【0092】

トランスジェニック形成のいくつかの方法において、導入遺伝子を受精卵母細胞の前核に導入する。いくつかの動物(例えば、マウス)について、受精をインビボで行い、そして受精卵を外科的に取り出す。他の動物において、卵を、生存している動物または死んだばかりの(例えば、屠殺場)動物から取り出し、インビトロで受精させ得る。導入遺伝子は、通常、マイクロインジェクション(Ogataら、U. S. P. N. 4, 873, 292)によって導入する。マイクロインジェクトされた接合体を適切な雌に移し、トランスジェニック動物またはキメラ動物を誕生させる。これは、導入遺伝子が組み込まれるときの発生期に依存する。キメラ動物は、真の生殖系列トランスジェニック動物を形成するために交配され得る。

【0093】

あるいは、導入遺伝子を、胚性幹細胞（ES細胞）に導入し得る。導入遺伝子は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、または当業者に公知である細胞のトランスフェクションのための任意の他の技術によってこのような細胞に導入し得る。形質転換細胞を、それらが起源する動物由来の胚盤胞と組み合わせる。この細胞は、胚に定着し、そしていくつかの胚において、これらの細胞は、得られるキメラ動物の生殖系列を形成する（Jaenisch、R.、Science 240:1468-1474、1988）。あるいは、ES細胞は、除核した受精卵中に移植して、これによってトランスジェニック動物を生じさせるために核の供給源として使用され得る。

【0094】

（乳汁における生体フィラメントの産生）

1つの例では、クモ糸遺伝子を、カゼイン遺伝子プロモーターを含む発現ベクターにサブクローニングする。これによって、クモ糸遺伝子の発現を、カゼイン遺伝子プロモーターによって制御させる。1つのこのような発現ベクターは、Rosen、J. M.（U. S. P. N. 5, 304, 489）およびMeadeおよびLonberg（U. S. P. N. 4, 873, 316）により記載のベクターに基づくカゼイン発現ベクターである。

【0095】

別の例では、WAP／糸遺伝子ハイブリッドフラグメント（実施例2において上述したEcoRIフラグメント）を精製し、そして受精マウス卵にマイクロインジェクトする。次いで、これを養母に移植する。WAP／糸遺伝子の存在を、当業者に周知の方法に従って、尾DNA（尾組織から単離したDNA）のサザンブロット分析によって同定する。次いで、ポジティブ創始動物を戻し交雑し、半接合体動物を生成する。この半接合体動物は、導入遺伝子発現の研究のために使用される。

【0096】

（尿における生体フィラメントの産生）

例えば、クモ糸遺伝子は、このクモ糸遺伝子がウロプラキンプロモーターの転

写制御下にあるように発現ベクターにサブクローニングされ得る (Linら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 679-683、1995により記載される)。

【0097】

尿は、そのpHおよび塩組成が、もっとも天然の構造での糸の形成に影響し得る特定の成分を取り込ませるように調整され得るという付加された利点を有する。

【0098】

(実施例9：乳汁および尿の両方において生体フィラメントを産生する「二重トランスジェニック」動物の作製)

その尿および乳汁の両方において生体フィラメントタンパク質 (例えば、クモ糸) を産生するトランスジェニック動物が、作製され得る。このような動物を構築するための1つの方法は、この2つの構築物で動物の胚細胞を形質転換することである。1つの構築物では、生体フィラメントコード核酸分子の発現が、乳汁産性細胞から生体フィラメントを発現させそして分泌し得るプロモーターによって指向され；そして第二の構築物では、生体フィラメントコード核酸分子の発現が、尿産性細胞から生体フィラメントを発現させそして分泌し得るプロモーターによって指向される。この方法では、二重形質転換細胞を使用して、トランスジェニック動物を作製する。

【0099】

従って、哺乳動物 (例えば、反すう動物) 接合体を、2つの核酸フラグメントを用いてマイクロインジェクト (または同時マイクロインジェクト) する：一方は、乳汁プロモーターの制御下で生体フィラメントタンパク質を発現し、そして一方は、尿特異的プロモーターの影響下で生体フィラメントタンパク質を発現する。作製されたトランスジェニック動物は、その乳汁および尿の両方において生体フィラメントを分泌/産生している。これは、トランスジェニック動物単位当たりで産生される生体フィラメントの総産生量を増大させる。

【0100】

その乳汁および尿において生体フィラメントを産生し得るこのような動物を産

生するための第二の方法は、乳汁産生細胞において生体フィラメントを発現し、そして分泌し得る構築物を有する胚性幹細胞、および尿産生細胞において生体フィラメントを発現し、そして分泌し得る構築物を有する胚性幹細胞を別個に生成し得ることである。次いで、両方の形質転換ES細胞型とも、起源となる動物由来の胚盤胞と組み合わせ、キメラ動物を生成する。次いで、これをホモ接合性まで交配し得る。

【0101】

この型の二重発現動物は、多くの利点を有する。第一に、両方の性の動物が、誕生から連続的に尿中に生体フィラメントを生成し、そして雌性動物は、次いで、乳汁分泌成体としてその乳汁中にさらなる生体フィラメントタンパク質を産生し得る。そして第二に、任意の個々の雌性動物により産生された生体フィラメントの量は、生体フィラメント変化のための必要に応じて増大（乳汁分泌を誘導することにより）または減少（乳汁分泌を誘導しないことにより）され得る。

【0102】

（実施例10：2つのモノマーからの生体フィラメントのタンパク質を同時発現し、アSEMBルするトランスジェニック動物の作製）

その乳汁、尿またはその両方中に生体フィラメントのタンパク質の正確なアSEMBルのためにともに必要とされる、2つのタンパク質を生成するトランスジェニック動物が、作製され得る。例えば、*Araneus diadematus* ドラグライン系は、ある比のADF3および4からなる。このような動物を構築するための1つの方法は、動物の胚細胞を2つの構築物で形質転換することである。この各構築物は、2つのタンパク質の一方を発現する。これらのタンパク質は、尿もしくは乳汁、または両方中に発現され得る。

【0103】

第二の方法では、ポリシストロンメッセージをコードする、実施例5に記載の構築物が用いられ得る。この構築物は、乳汁、尿、または両方中にその産物を分泌し得る。一旦2つのタンパク質が同じ液中に存在すると（すなわち、乳汁中に両方または尿中に両方）、それらは正確にアSEMBルし、精製され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1Aは、 β カゼインプロモーターおよびシグナル配列、1.5 kb NcDS-1 cDNA、および β カゼイン由来の3' UTRを含む、ヤギ β カゼイン/NcDS-1構築物の模式図である。

図1Bは、WAP遺伝子プロモーター、WAPシグナル配列、ドラグライン系(NcDS-1)をコードする1.5 kb cDNA、およびWAP遺伝子の3'末端を含む、乳清産生タンパク質(WAP)/NcDS-1構築物の模式図である。

図1Cは、ウロブラキンII遺伝子由来のプロモーターおよびシグナル配列、NcDS-1 cDNA挿入物、およびマウスプロタミン-1(Mp-1)遺伝子由来の3' UTR領域を含む、ウロブラキンII/NcDS-1構築物の模式図である。

【図2】

図2は、本発明の発現ベクターの図である。

【図1】

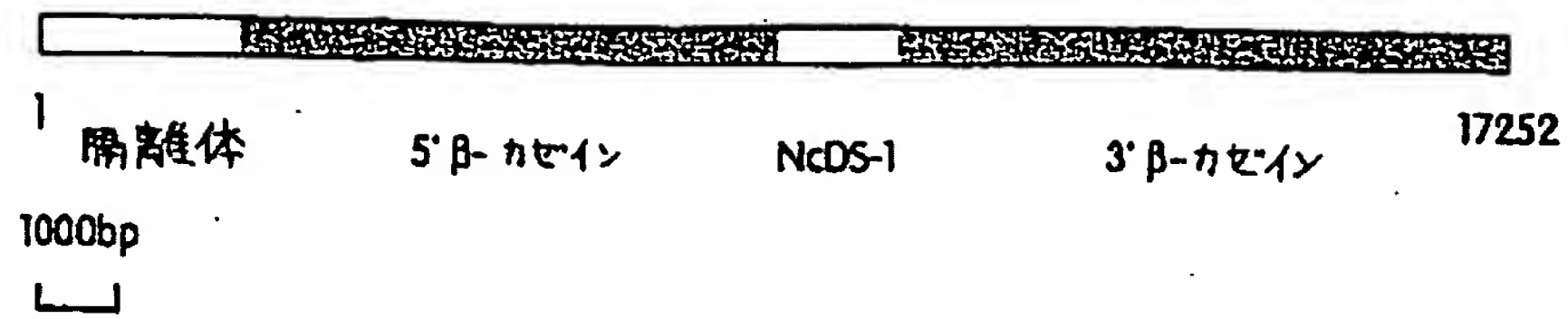


図 1A

βカゼイン/NcDS-1

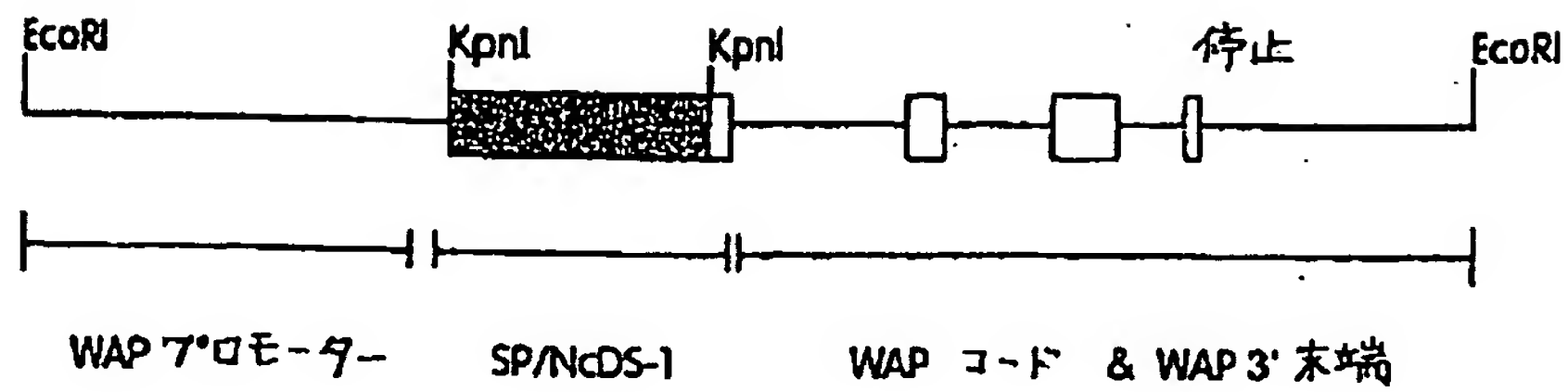


図 1B

WAP/NcDS-1 構築物

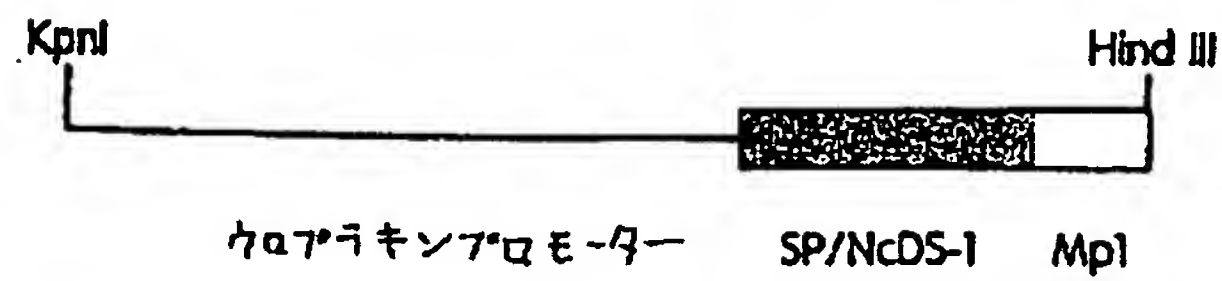
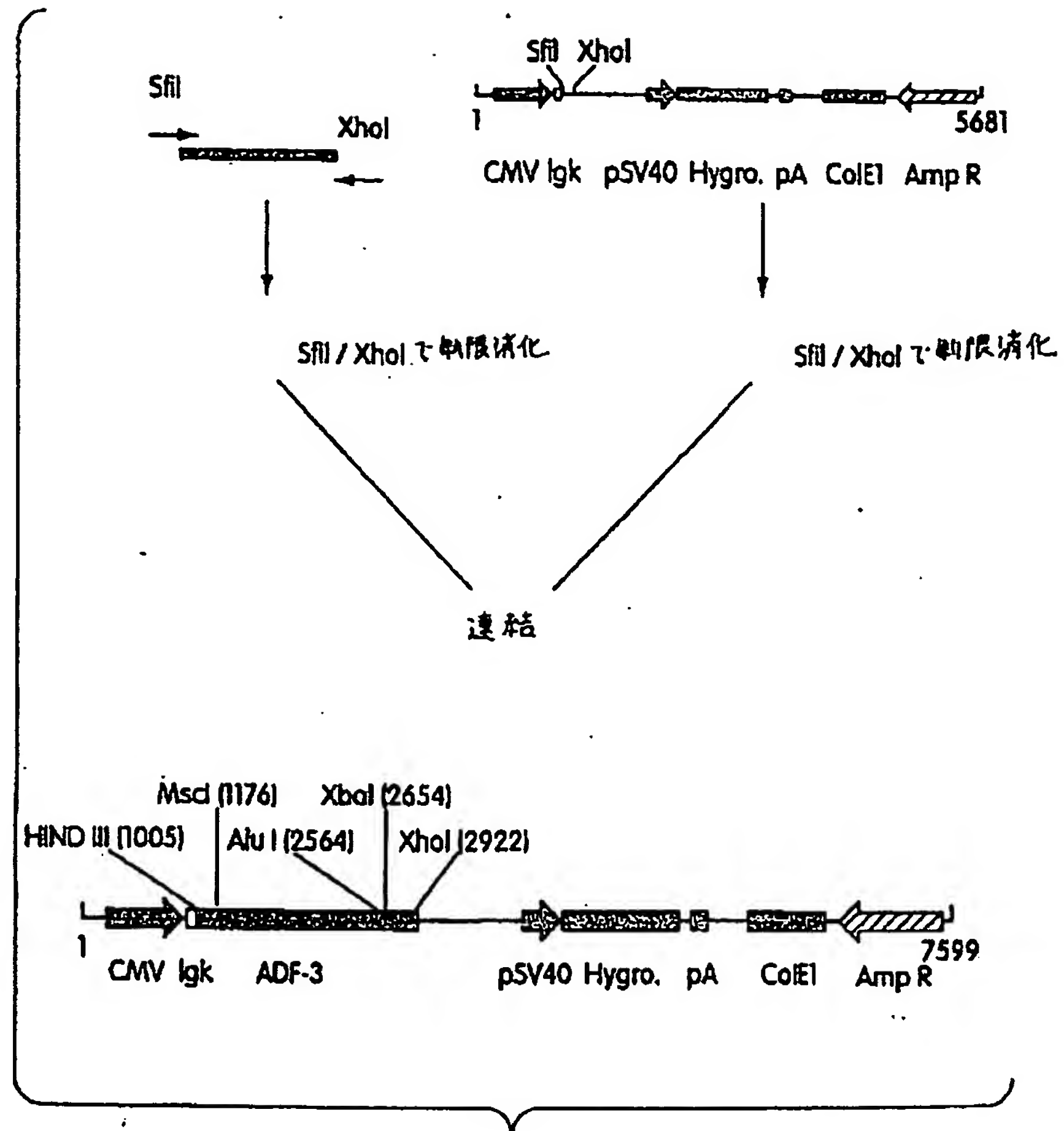


図 1C

WAP/NcDS-1 構築物

【図2】



pSecTag/ ADF-3 発現ベクター

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/11 A01K67/027		International Application No. PCT/IB 99/00763
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	S.H. LEE ET AL.: "Production of biomedical proteins in the milk of transgenic dairy cows: the state of the art" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 29, 1994, pages 213-221, XP002120416 the whole document	1-21
Y	D. ROMOGNULO ET AL.: "Transgenic approaches for modifying the mammary gland to produce therapeutic proteins" ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES, vol. 102, 1994, pages 846-851, XP002120417 the whole document	1-21
Y	EP 0 771 874 A (STATE OF ISRAEL-MINISTRY OF AGRICULTURE) 7 May 1997 (1997-05-07) the whole document	1-21
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "d" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 October 1999		Date of mailing of the international search report 17/11/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5515 Petersplein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Marie, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 99/00763

C.(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	D.E. KERR ET AL.: "The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine" NAT. BIOTECHNOL., vol. 16, no. 1, 1998, pages 75-79, XP002120418 the whole document	1-21
Y	B. MEYER-PUTTLITZ ET AL.: "Ectopic expression of a bacterial LacZ gene in the limbic system of transgenic mice" NEUROREPORT, vol. 6, no. 12, 1995, pages 1674-1678, XP002120419 the whole document	1-21
Y	NING XU ET AL.: "Structure of a protein superfiber: spider drag line" PNAS, vol. 87, 1990, pages 7120-7124, XP002120420 the whole document	1-21
Y	J.T. PRINCE ET AL.: "Construction, cloning and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk" BIOCHEMISTRY, vol. 34, 1995, pages 10879-10885, XP002120421 the whole document	1-21
Y	C.Y. HAYASHI ET AL.: "Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 275, 1998, pages 773-784, XP002120422 the whole document	1-21
Y	NO 97 08315 A (R. BASEL ET AL.) 6 March 1997 (1997-03-06) the whole document	1-21
Y	A.D. PARKHE ET AL.: "Structural studies of spider silk proteins in the fiber" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 10, 1997, pages 1-6, XP002120423 the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IB 99/00763

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0771874 A	07-05-1997	AT 171724 T	15-10-1998
		DE 69600719 D	05-11-1998
		DE 69600719 T	27-05-1999
WO 9708315 A	05-03-1997	AU 7152996 A	19-03-1997
		BR 9612625 A	01-06-1999
		CN 1200145 A	25-11-1998
		EP 0848754 A	24-06-1998

フロントページの続き

(72)発明者 ターナー, ジェフリー ディー,
カナダ国 ジェイ0ピー 1エイチ0 ケ
ベック, ハドソン, リリー ロード
1

(72)発明者 カラザス, アンソウラーラザリス
カナダ国 エイチ9ダブリュー 2エイチ
4 ケベック, ベーコンズフィールド,
シャーウッド 251

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA04 DA02 EA04
FA02 FA18 GA11 GA18 HA03
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA20
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14
AC15 BA02 CA24 CA60